

# 種子伝染性病害をめぐる最近の国際動向 VI

タキイ種苗株式会社 しおみ ひろし くさの しんたろう  
塩見 寛・草野 新太郎  
 株式会社サカタのタネ いがらし みつる きど かずたか  
五十嵐 充・木戸 一孝

## はじめに

本報第 I 報で、駒田・浅賀（1998）が種子伝染性病害に関して欧米で大きく動き始めたこと、それに対して種苗業界で国際健全種子推進機構（International Seed Initiative : ISHI）を組織して種子健全性検査法（Seed health test）の国際標準化の取り組みを始めたことを報告した。その後、本報の続報の中で、ISHI の取り組みや成果、種子健全性検査についての欧米での考え方、関連機関の動き等を紹介してきた（浅賀・駒田，2000；駒田，2000；塩見・五十嵐，2005；塩見ら，2008）。前報から 6 年を経過し、種子健全性検査に対する考え方も少しずつ変わってきた。また昨年 11 月には、ISHI で検査法策定作業を担当している技術調整グループ（TCG）会議を 7 年ぶりに日本で開催したことから、種子健全性検査法策定の現在の状況、欧米での種子健全性検査の動向や種子伝染性病害に対する取り組みを紹介する。さらに近年、ウリ類果実汚斑細菌病（BFB）やジャガイモやせいもウイロイド（PSTVd）等、種子伝染性病害が植物検疫上の問題になることが多くなっている。これらについても現在の各国の動きとあわせて紹介する。

## I 種子健全性検査法の国際標準化

野菜の種子取り扱いにおける主要 5 か国（フランス、オランダ、米国、イスラエル、日本）の種苗業者が、各国の種子検査機関や検査会社、研究者とともに、種子健全性を評価する検査法の国際標準化のために組織したのが ISHI である。その後、スペイン、インド、韓国をオブザーバー国として加え、8 か国で作業を進めている。

ISHI で策定した国際標準の検査法（ISHI 法）は、政府機関が加盟している国際種子検査協会（International Seed Testing Association : ISTA）に送られて、ISTA 検査法として採択されるシステムができあがっており、1994 年の ISHI の前組織での活動開始から今までに、

Current Status in Seed Health in the World VI. By Hiroshi SHIOMI, Sintaro KUSANO, Mitsuru IGARASHI and Kazutaka KIDO

（キーワード：種子伝染性病害，種子健全性検査，国際健全種子推進機構（ISHI），国際種子検査協会（ISTA），ウリ類果実汚斑細菌病，PSTVd）

表-1 にあげた 11 の検査法が ISHI 提案で ISTA 採択されている。

このほか、表-2 にあげたように、トマトかいよう病、ウリ科果実汚斑細菌病をはじめとする多数の病害の検査法策定を進めている。この二つの表を見るだけでも、現在、どのような病害が種子伝染性病害として世界で重要視されているかを理解いただけるものと思う。

これらの検査法については、ISHI の上部組織である国際種子連盟（International Seed Federation : ISF）のホームページ（[http://www.worldseed.org/isf/ishi\\_vegetable.html](http://www.worldseed.org/isf/ishi_vegetable.html)）で、暫定版の段階から公開し、広くコメントを求めている。

ISHI では、ISTA に採択された検査法についても、常に検査法の見直しを行って、その信頼性を高める努力を続けている。これら ISTA で採択された検査法や ISHI 法は、米国の種子健全性システム（National Seed Health System : NSHS）をはじめ、各国、各種苗会社や検査機関での採用が進み、実際の検査の場で使われるようになってきている。このように、民間主体の組織の活動が世界の公定法策定につながってきている。

## II 検査法の動向

表-1 にあるように、これまでに ISHI で策定された検査法は、糸状菌はプロッター法（湿らせてる紙上に種子置床）あるいは培地上に種子を置床して菌叢形成を確認する、細菌はそれぞれの対象病原菌を選択的に検出できる選択培地に種子抽出液を塗布してコロニー形成を確認する、ウイルスは種子抽出液で ELISA を行う、あるいは接種による生物検定というように、検査法とその手順自体はシンプルなものである。これは、既知の技術を採用することにより、誰が行っても安定した結果が得られることを目指したためである。しかし、近年、様々な病原体に対する種子健全性検査の要望の高まり、処理（消毒）種子の評価の必要性、遺伝子診断技術の導入等により検査方法が変わりつつある。

### 1 処理種子の検査

実際に流通している種子は何らかの種子処理（種子消毒）が行われていることが多いため、各検査法が処理種子の検査に適用できるか、適用する場合はどのような種

表-1 ISHI で策定した種子健全性検査法

作物	病名あるいは病原菌名	検査法 <sup>a)</sup>	採択年
ISTA 採択された検査法			
ダイズ	ホモブシス腐敗病ほか <i>Phomopsis</i> 属菌による病害	培地に種子置床	2002
ニンジン	黒葉枯病	ブロッカー法あるいは培地に種子置床	2002
	黒斑病	ブロッカー法あるいは培地に種子置床	2002
アブラナ科	黒腐病	種子抽出液を選択培地に塗布 確認試験に PCR 追加 処理種子検査法として種子磨砕追加	2004 2012 2013
インゲン	葉焼病	種子抽出液を選択培地に塗布 確認試験に PCR 追加	2006 2013
	かさ枯病	種子抽出液を選択培地に塗布	2007
エンドウ	つる枯細菌病	種子抽出液を選択培地に塗布	2013
ニンジン	斑点細菌病	種子抽出液を選択培地に塗布	2005
ウリ類	SqMV, CGMMV, MNSV	種子抽出液を ELISA	2009
エンドウ	PSbMV, PEBV <sup>b)</sup>	種子抽出液を ELISA	2007
トマト	トバモウイルス (TMV, ToMV)	種子抽出液を抵抗性タバコに接種して 局部壊死斑形成確認	2012
ISHI 法にとどめて ISTA 提案していない検査法 <sup>c)</sup>			
トマト	PepMV <sup>c)</sup>	種子磨砕抽出液を ELISA	
レタス	LMV	種子あるいは発芽苗の磨砕抽出液を ELISA	

<sup>a)</sup> 最初に行う検査法であり、これで疑わしい場合は二次検査で確認する。

<sup>b)</sup> 国内未発生。

<sup>c)</sup> 汚染種子確保が困難なため ISTA 提案に十分なデータが取れないなどの理由で ISHI 法にとどめている。

子処理ならばよいのかを検査法ごとに明記している。具体的には、乾熱などの物理的処理、次亜塩素酸カルシウムやリン酸三ナトリウム処理等、化学的処理であっても洗浄で薬剤が種子に残らないものならば適用可能としているものが多い。

種子処理を行った種子において、種子内部に残った病原菌を ISTA 法で検出できないという事例が出てきたため、処理種子対象の検査法開発が進められてきた。アブラナ科黒腐病では種子を磨砕する方法を採用し、ISTA 検査法に 2013 年に追加した。しかし、種子磨砕することで逆に腐生菌の増殖が増えたり、溶出してくる種子成分が検出感度に影響する恐れがあるため、この方法の対象を処理種子に限定している。

そのほかに、処理種子対象に検出感度を上げる方法として、Bio-PCR (種子抽出液を選択培地上で短期間培養し、増菌させてから回収して PCR) を検討してきたが、

腐生菌の影響が大きいことから採用には至っていない。

## 2 遺伝子診断法の採用

PCR はこれまで分離菌株の同定などに使ってきたが、ここ数年で、サンプル種子抽出液から直接 PCR で検出する (direct-PCR と呼んでいる；以下 d-PCR) 取り組みが増えてきた。しかし、種子抽出液からの PCR による直接検出では検出感度が不十分であることが多く、ここにリアルタイム PCR で定量的に検出する方法を適用しようとしている。リアルタイム PCR による d-PCR は検査時間を一気に短縮できるだけでなく、より高い検出感度が求められる処理種子への適用も検討されている。ただし、リアルタイム PCR であっても、病原菌の生死判定ができないことには変わりはなく、確認試験 (二次検査) での培地試験や接種試験が不可欠である。また、欧州の種苗会社では、LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法の検討を始めているところもある。

表-2 ISHI で検査法策定中の病害と候補の検査法など (抜粋)

作物	病名あるいは病原菌名	検査法や検討事項等
アブラナ科	黒腐病	(選択培地法が ISTA 採択済み) 検出感度向上のため d-PCR, Bio-PCR 追加
	黒斑細菌病	種子抽出液を選択培地に塗布, あるいは d-PCR, Bio-PCR
	根朽病	(2,4-D プロッター法による ISTA 法あり) 凍結プロッター法追加
	黒斑病, 黒すす病	種子抽出液を d-PCR
タマネギ	灰色腐敗病	選択培地に種子置床
ニンジン	斑点細菌病	(選択培地法が ISTA 採択済み) 処理種子検査に Bio-PCR と d-PCR
セルリー	葉枯病	プロッターあるいは種子洗浄液接種
コーンサラダ (マーシュ)	<i>Acidovorax</i> 属細菌 <sup>a)</sup>	Sweat-box 法で ISTA 提案中
	べと病 <sup>a)</sup>	グロウアウト法
ハウレンソウ	バーティシリウム萎凋病	プロッター法あるいは培地に種子置床
レタス	LMV	ELISA による ISHI 法に確認試験として PCR 追加
トマト	かいよう病	(種子抽出液を選択培地に塗布する暫定版 ver. 4.1 検査法あり) spiking 精度の向上 検出感度向上のため d-PCR
トウガラシ	トバモウイルス (TMV, ToMV, PMMoV)	種子抽出液を抵抗性タバコ品種に接種
ウリ類	果実汚斑細菌病	Sweat-box あるいは d-PCR
	つる 枯病	プロッター法あるいはロールタオル法
	SqMV	ELISA による ISTA 法に確認試験としてグロウアウト法追加

<sup>a)</sup> 国内未発生.

### 3 indirect test 適用の規定

検査法には direct test (グロウアウト, プロッター, 培地, 接種等; 以下 DT) と indirect test (PCR, ELISA, IF (蛍光抗体法) 等; 以下 IT) の手法があるが, 一次検査に IT を採用することが増えてきたことから, ISF のガイドラインを作成した。すなわち, 一次検査を IT で行って陰性ならば, 二次検査は不要。一次検査が陽性ならば, DT (特に接種試験) による二次検査を行う。この際に, 適当な DT 法がなければ, 一次検査とは別の手法で二次試験を行う。

また, 先に紹介したように, 検査法に遺伝子診断技術を採用することが増えてきたことから, 遺伝子診断技術による検査法の評価, 採用, 運用に関するガイドラインの作成も進めている。

### 4 spiking の採用

種子から病原菌を検出する過程において, 種子に存在する腐生菌や種子に含まれる物質が検出感度に影響する

可能性があることから, 種子抽出液に病原菌を一定濃度で加えたサンプルを作り, その回収率を調査することで, 検査自体が正確に行われたことを確認する「spiking」と呼ばれる方法の採用をすすめている。まずはトマトかいよう病の暫定版 ver. 4.1 検査法に採用し, そのほかの病害についても主に細菌病で採用を検討している。

### 5 接種試験の代用としての遺伝子診断技術の導入

一次検査で陽性と判断された場合, 確認試験と呼ばれる二次検査でその種子ロットの健全性を最終判断する。この二次検査には病原性確認を目的とした接種試験を行うことが多いが, 大量の種子ロットについて短期間で検査結果を出す必要があることから, この接種試験を PCR による病原菌の特異的遺伝子の検出で代用しようという動きが強まっている。その契機となったアブラナ科黒腐病では, 1,400 以上の菌株を集めて PCR の結果と病原性確認結果を比較し, その信頼性を評価したうえで 2012 年に ISTA 検査法に追加した。さらに 2013 年にイ

ンゲン葉焼病の二次検査にも PCR を追加し、そのほかにも主に細菌病で適用を検討している。

### 6 小ロットの検査

ISHI では検査法ごとに推奨の最小サンプルサイズを規定しており、たとえば、トマトかいよう病の暫定版 ver. 4.1 検査法では1万粒である。しかし、育成系統、試作品種や原種等ではこの検査粒数が確保できないことがある。オランダでの試験データとその統計解析結果から、このような小さいロットであっても、ロット種子量の10%以上の量を検査しないと正確に評価できないことが示された。

## III 種子健全性に関する欧州での取り組み

欧州では種子伝染性病害に対する認識が高く、複数のプロジェクトが実施され、また現在進行中である。

### 1 PEPEIRA

*Pepino mosaic virus* (PepMV) は、1980年にペルーのペピーノで見つかったウイルスであるが、1999年に欧州数箇国のトマトで発生し、数年のうちには世界に広がった (EPPO, 2013)。主には接触伝染であるが、低率ではあるものの種子伝染もすることから、ISHI では ELISA による検査法を2007年にISHI法として確定した。

PEPEIRA の正式名称は長いので省略するが、2007年から4年間、EU17か国の20ラボが参加して、PepMVの圃場調査やリスク評価、検査法開発を行った。その結果はEUの検疫措置の根拠となり、種子伝染率についても0.026%という値が得られている (HANSEN et al., 2010)。また、ELISAとPCRを組合せた検査法がEPPO (欧州植物検疫機構) 法として採用された (EPPO, 2013)。

### 2 GSPP (<http://www.gspp.eu/>)

欧州ではこれまでに何度か種子汚染が原因と見られるトマトかいよう病の発生があったが、そのうち2007～08年の発生を契機に、オランダとフランスの種子検査機関を中心に Good Seed and Plant Practices (GSPP) 認証制度が生まれた。これは、種子および苗の生産段階から厳密な衛生管理を行い、かいよう病に汚染されていないことを認証するものであり、トマト種苗生産のISO認証といえる。種子については、原種の検査から始まり、採種施設、栽培管理、種子調製、種子処理、検査等、プロセスを追って詳細に規定されている。そのうち、検査法にはISHI暫定版 ver. 4検査法が採用されている。また、GSPPの種子検査室基準は米国NSHSでの検査室認証への採用が検討されている。基本的にはオランダとフランス、さらにはEU諸国での販売トマト種子が対象で

あるが、欧州以外でもGSPP認証を取得する動きがある。

### 3 TESTA (<https://secure.fera.defra.gov.uk/testa/index.cfm>)

これも正式名称は長いので省略するが、2012年10月よりEUの40箇月プロジェクトとして始まったもので、種子伝染の確認、種子健全性検査法策定、種子消毒法の開発等を行う。検査法策定についてはISHIと関連することから、TESTA諮問委員会にはTCG議長を送り、各プログラムにもTCGメンバーが参加することになっている。

## IV 植物検疫にかかわる問題

### 1 ウリ類果実汚斑細菌病 (BFB)

2012年春、輸入の汚染種子に起因するスイカ果実汚斑細菌病が国内で発生し、今回は特に育苗中の二次伝染で被害が広がった。植物防疫所を中心とした関係機関による徹底した防除措置により封じ込められたが、本病が重要な種子伝染性病害であるということを再認識させられた。日本は発生国からのスイカ、メロン、トウガンの輸入種子について栽培地検査を求めている。

本病の種子健全性検査法としては、米国の種子検査会社Eurofins STA LaboratoriesのGreenhouse growout (温室内でのグロウアウト) 法と、オランダの種子検査機関NaktuinbouwのSweat-box growout (高湿密閉容器中でのグロウアウト) 法が世界的に高い評価を受けていたが、Naktuinbouwでは2012年よりリアルタイムPCRによるd-PCR検査を始めた。また、日本の種苗管理センターでも独自開発のSweat-bag seedling法 (発芽苗上で病原菌を増菌させ、選択培地あるいはLAMPで検出) での受託検査を同年より始めている。これに対してISHIではSweat-box法あるいはd-PCRでの検査法策定を進めている。

### 2 トマトPSTVd

ジャガイモの重要病原体の一つであるジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) は、トマトにも黄化、えそ、矮化等の症状を起こして大きな被害を及ぼす。伝染方法は感染株の汁液による接触伝染、苗や栄養体での伝染のほか、明確に種子伝染することが確認されており、ニュージーランドや英国での発生は汚染種子が原因だと考えられている (O'NEILL and MUMFORD, 2006)。各国ともPSTVdを植物検疫上の重要病原体として、侵入を防ぐための植物検疫措置を取っている。日本では2008年に福島県の施設栽培トマトで発生し、2010年にはギリシアでの感染が確認されたが、どちらも徹底した防除措置により撲滅された。日本は発生国からのトマトの輸入種子

に対して栽培地検査を求めている。

ISHI メンバー各国とも PSTVd を扱えるラボに限られており、種子検査法策定のための比較試験（複数国の複数ラボで同じ検査法によって同じ汚染種子からの検出を行って、検査法の再現や安定性等を評価する）が実施できないことから、ISHI としての検査法策定に取り組めずにいたが、昨年の TCG 会議で、オランダ Naktuinbouw より RT-PCR による検査法プロトコルと評価データの開示を受けたことから、これらを詳細に検討し、この検査法を ISF のホームページに掲載することを決めた。

### おわりに

9 箇月ごとに参加国の回り持ちで開催していた ISHI の TCG 会議は、2011 年 6 月に札幌開催の準備を進めていたが、他の国際会議と同様に、同年 3 月の東日本大震災とそれに引き続く原発事故の影響で、他国での代替開催を余儀なくされた。震災から 2 年半となる昨年 11 月に福岡で TCG 会議を開くことができ、8 か国 54 名が集まって種子健全性検査法策定のための熱い議論が交わされた。今回は種苗管理センターに加え、植物防疫所からもオブザーバー参加をお願いし、また、農研機構花き研

究所の松下陽介研究員に pospiviroid の最新の研究成果を講演してもらった。国内には種子伝染性病害を専門とする研究者はほとんどいないが、検査法策定につながる有用な研究が行われていることを実感した。今後も種子伝染性病害や種子健全性検査に関する海外の動向を皆様にお知らせするとともに、ISHI の場を通じて、国内の研究成果を検査法策定に反映させる努力を続けたい。

ISHI では検査法策定に向けて、様々な予備試験や複数ラボでの比較試験を実施している。試験経費は参加者負担であるが、試験に最適の汚染種子（自然感染）を使った検査の経験を積むことができ、検査法についての考え方を知る機会にもなることから、興味のある方の参加を願っている。

### 引用文献

- 1) 浅賀宏一・駒田 旦 (2000): 植物防疫 54: 429 ~ 433.
- 2) EPPO (2013): EPPO Bulletin 43: 94 ~ 104.
- 3) HANSEN, I. M. et al. (2010): Eur. J. Plant Pathol. 126: 145 ~ 152.
- 4) 駒田 旦・浅賀宏一 (1998): 植物防疫 52: 23 ~ 30.
- 5) ——— (2000): 同上 54: 518 ~ 522.
- 6) O'NEILL, T and R. MUMFORD (2006): Factsheet, HDC Project No.PC212, UK.
- 7) 塩見 寛・五十嵐 充 (2005): 植物防疫 59: 76 ~ 78.
- 8) ———ら (2008): 同上 62: 213 ~ 216.

---

## 発生予察情報・特殊報 (26.3.1 ~ 3.31)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫（発表都道府県）発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたは JPP-NET (<http://www.jpnp.net/>) でご確認下さい。

■キュウリ：アシビロヘリカメムシ（東京都：初）3/10  
 ■アスパラガス：疫病（秋田県：初）3/20

■ピーマン：モトジロアザミウマ（宮崎県：初）3/31